



WFI Y ESTERILIDAD (I). EQUIPOS DE GENERACIÓN

La contaminación en la industria biotecnológica es un grave problema para los fabricantes de medicamentos estériles o parenterales basados en procesos de fermentación.

Santiago Fernández, Area manager Italy & Iberia, BWT Pharma and Biotech

LA MAYORÍA LAS PÉRDIDAS DE CULTIVOS INDUCIDAS POR LA CONTAMINACIÓN SON DEBIDAS A CONTAMINANTES BIOLÓGICOS: bacterias, micoplasmas, levaduras, hongos e incluso otras líneas celulares. También las endotoxinas, subproductos de la eliminación de las bacterias gram -, pueden ser causa de problemas en algunos tipos de cultivo.

Uno de los canales por lo que esa contaminación puede producirse, en particular bacterias gram - y endotoxinas, es a través del agua. Esa agua puede ser tanto de proceso, como utilizada como excipiente o para procesos de limpieza.

La reciente 'Guideline on the quality of water for pharmaceutical use' de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) nos da indicaciones para la selección de la calidad del agua según el tipo de medicamento, siendo el agua para inyectables (WFI) la calidad mínima para su uso como excipiente en medicamentos estériles. Para la fabricación de APIs para inyectables es posible utilizar agua purificada (PW) si hay pasos posteriores de esterilización o WFI cuando se trate de los pasos finales de purificación y aislamiento. Los lavados finales de equipos para la producción de productos parenterales se realizarán preferiblemente con WFI.

En la práctica las recomendaciones de la guía de la EMA, y a no ser que por coste se justifique la implementación de una distribución paralela de agua purificada (PW), significan que en una operación de escala media se utilizara de forma casi exclusiva WFI como agua para todos los usos. Recordemos que el agua para inyectables debe cumplir con una exigente limitación tanto en endotoxinas como en bacterias:

Agua para Inyectables (WFI)			
Parámetro	Unidades	USP	Ph. Eur. (granel)
Bacterias aerobias	CFU/100ml	≤ 10	≤ 10
Endotoxinas bacterianas	EU/ml	≤ 0.25	-
Endotoxinas bacterianas	I.U./ml	-	≤ 0.25

Estos estrictos requisitos están más que justificados, ya que los efectos potenciales para la salud debidos a contaminaciones, ya sea microbianas o por endotoxinas, en medicamentos parenterales podrían llegar a ser fatales. La esterilidad del WFI es clave para asegurar la calidad requerida por la farmacopea.

Esas mismas farmacopeas permiten hoy por hoy la generación de WFI con diversas tecnologías (destiladores multiefecto, destiladores por termocompresión y equipos de membrana) ya que, todas ellas pueden asegurar los requisitos compendiales para el WFI.

Sin embargo, en ciertos procesos biológicos, como por ejemplo la fermentación de antibióticos, los riesgos de afectación al proceso son tales que ningún nivel de contaminación microbiana puede ser aceptable. Por ello, en este artículo exploraremos si alguna de esas tecnologías de generación puede asegurar una esterilidad superior y, para ello, nada mejor que empezar definiendo lo que entendemos por esterilidad.

ESTERILIZACIÓN Y ESTERILIDAD

La esterilización puede definirse como el proceso mediante el cual se destruyen, eliminan o inactivan permanentemente todas las formas de vida presentes en un medio. Aunque, según esta definición, la esterilidad es un concepto absoluto, en la práctica industrial la esterilización se refiere a menudo al proceso mediante el cual la probabilidad de supervivencia de los organismos no deseados se reduce a un nivel arbitrariamente bajo. Normalmente, este nivel es tan bajo que la posibilidad de que incluso un organismo sobreviva al proceso de esterilización puede considerarse insignificante.

Alcanzar esos niveles en un sistema WFI no es tarea fácil ya que los procesos de esterilización se verán afectados por muchas variables (por ejemplo: el número de organismos iniciales, la variabilidad intrínseca de la

resistencia de cada microorganismo individual, la dificultad para aplicar los métodos de esterilización en partes concretas de un equipo determinado...) que no pueden controlarse de forma absoluta.

La eficacia de los sistemas de esterilización la medimos a partir de su capacidad para reducir una determinada concentración de microorganismos en un tiempo dado. Lo cierto es que, aunque existen diversas formas de medir esa eficacia, el parámetro D es quizás el más universal ya que es posible usarlo para esterilizaciones térmicas, químicas o por radiación. Este parámetro nos dará de una manera cuantitativa la resistencia de un microbio a un determinado tratamiento de esterilización. Es un parámetro que se expresa en tiempo y que usualmente se refiere al número de logaritmos que se han reducido en ese tiempo, por ejemplo, $D_{99} = 600$ s indica que un determinado tratamiento reduce dos logaritmos (1/100) en 10 minutos un determinado microorganismo. (Recordar que la esterilización se refiere a probabilidades, por lo que una reducción del 1/100 debe entenderse como que existe una probabilidad del 1/100 que el producto esterilizado siga contaminado).

Por otro lado, en esterilización termal también es habitual usar el parámetro F_0 que se deriva del parámetro D y que mide la cantidad de tiempo equivalente en minutos a que se ha aplicado una temperatura de 121°C a un producto en el proceso de esterilización. Más adelante veremos la utilidad de este parámetro para comparar diversos métodos generación de WFI termal.

Los procesos de esterilización habituales en la industria farmacéutica en agua compendiales incluyen la esterilización termal, la filtración, la inactivación química y la radiación. Aunque los procesos de esterilización usados en la generación y la distribución de WFI pueden ser similares o coincidentes, cada subsistema tiene sus particularidades, por ello y dado que tenemos un espacio limitado, en este artículo solo nos referimos a la esterilidad en sistemas de generación por filtración y por procesos termales dejando los sistemas de distribución para una próxima ocasión.

LA ESTERILIZACIÓN DE WFI POR FILTRACIÓN

A diferencia de la esterilización termal que busca la inactivación de los microorganismos presentes en el medio, la filtración busca una remoción física de los mismos con una malla que permita el paso del agua, pero no de los microbios. Para ello, es menester asegurar un tamaño de poro consistente y homogéneo que no se vea

afectado por variables como la presión o la temperatura, lo que no es fácil, razón por la cual históricamente la filtración no ha gozado del favor del regulador cuando se trata de garantizar la esterilidad.

Además, la prueba absoluta de la eficacia de la filtración es difícil de establecer a pesar de las numerosas mejoras introducidas en la fabricación de filtros y, aunque es posible realizar pruebas de integridad, y estas también han mejorado mucho, no nos dan más que una fotografía puntual del estado de ese filtro en un cierto momento.

Otra de las objeciones que se pueden poner a la esterilidad por filtración es que no admite un análisis similar al de otras técnicas que si permiten trasladar experiencias de campo a valores D o F_0 . Los filtros deben validarse asegurando un corte molecular y una capacidad de retención dados usando un organismo indicador (que habitualmente es la B. diminuta) y todo ello combinado con tests de integridad¹.

Sin embargo, en marzo del 2016 la Comisión Europea² partiendo de las evidencias sobre la obtención consistente de WFI con equipos de filtración, y tras consultas con los distintos actores del sector, adoptó la actualización de la monografía para WFI 0169 de la Ph Eur que permite la fabricación de WFI con esas técnicas (que ya habían sido aceptadas por la FDA y la farmacopea japonesa). De hecho, en el caso de WFI es más preciso referirnos a sistema de membrana y filtración, ya que habitualmente combinaremos diferentes tecnologías.

La monografía 0169 de la Ph Eur se refiere a osmosis inversa (de uno o dos pasos) combinada con otras técnicas como la electrodesionización, la ultrafiltración o la nanofiltración. Esta combinación de tecnologías es un tanto confusa. La nanofiltración tiene un corte molecular superior al de la osmosis lo que la hace poco efectiva después de ella, y la electrodesionización no tiene ningún efecto sobre la calidad microbiológica del agua, si acaso, el de empeorarla. La ultrafiltración, por su parte, también tiene un corte superior a la osmosis pero, a diferencia de esta y de la nanofiltración, es un filtro absoluto lo que nos permite colocarla como barrera final.

Por ello los sistemas de membrana para generación de WFI normalmente están configurados como un paso o dos de osmosis seguidos (o no) de un EDI y terminan con una ultrafiltración. Esta configuración es sólida y usa como caballo de batalla a la osmosis ya que con su bajo corte (menos de 10 kD) nos asegura un rechazo no solo de la mayor parte de sales, sino de todo tipo de virus, bacterias y pirógenos. Lamentablemente

la osmosis no es un filtro absoluto ya que, la membrana semipermeable con la que está construida es sensible a presión y temperatura y, puede dañarse fácilmente con productos químicos como el cloro u el ozono, razón por la que una ultrafiltración tiene todo el sentido después de la osmosis (o del EDI si lo requerimos por cuestiones de calidad química).

¿Y qué tan eficaz es esta combinación? Por un lado, y como ya constato la EMA, la industria ha venido generando durante años agua purificada (PW) con muy bajos niveles de bacterias y endotoxinas con equipos de membrana de forma regular y consistente.

En un estudio conjunto de BWT con la School of Life Sciences de la Universidad de Ciencias aplicadas y Artes del Noroeste de Suiza fue posible testar de forma extensiva una unidad de doble paso de osmosis más EDI y UF (Fig 1), incluyendo pruebas de retención microbiológica, de retención de endotoxinas, de integridad de UF y de TOC , entre otros.

Los resultados confirmaron que el comportamiento de estos equipos y, que como era previsible, es la primera etapa de osmosis la que realiza el trabajo de rechazo de bacterias tal y como se observa en la Figura 2, llegando a ofrecer reducciones de 4-5 logaritmos. La segunda etapa nos proporciona una seguridad adicional y la etapa final de UF, además de proveer una barrera absoluta, consigue una mejora en los niveles de retención de bacterias y endotoxinas en operación.

Por lo que respecta a los valores de retención de endotoxinas de nuevo se consigue una eficaz reducción en la primera etapa de osmosis (Fig 3) y disponemos de dos etapas más (osmosis y UF) para garantizar la calidad requerida.

Así que un equipo de membrana es más que capaz de conseguir consistentemente calidades de WFI, incluso muy superiores microbiológicamente, pero dada la susceptibilidad de esos equipos a factores externos, ¿tenemos alguna manera de asegurar que el funcionamiento es conforme a los parámetros de diseño? Lo cierto es que sí. Disponemos de dos potentes herramientas de control, una indirecta y otra directa.

Por un lado, la conductividad a la salida de cada etapa de osmosis cuando la comparamos con los valores de entrada nos permite saber en todo momento si las membranas están trabajando de acuerdo con sus parámetros de diseño, es decir, rechazando las sales iónicas correctamente. Dado que cualquier daño a la membrana dispararía la conductividad de forma inmediata y puesto que cualquier microorganismo está muy por

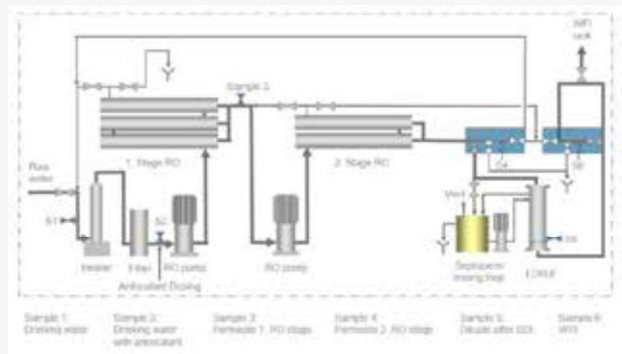


Figura 1.

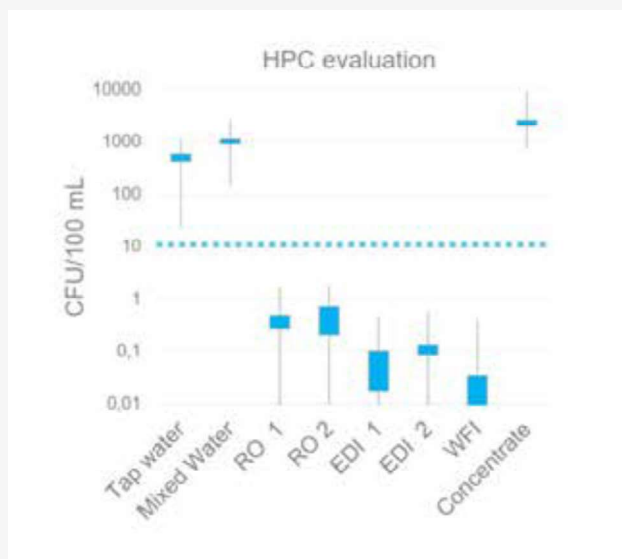


Figura 2.

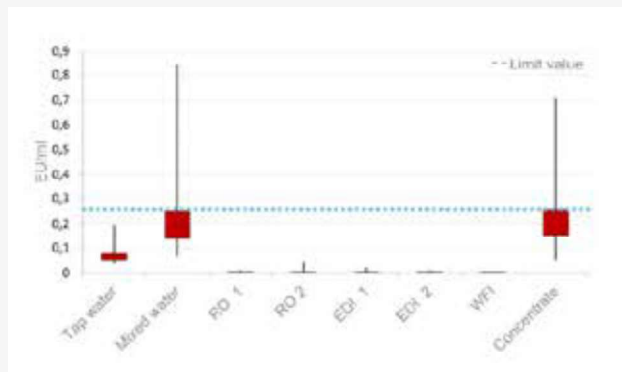


Figura 3.

encima del rango de rechazo iónico disponemos de un potente mecanismo de alerta.

Y si esto no nos satisface, también disponemos de equipos de control microbiológico rápido (RMM) que permiten un control directo de las células viables totales y, por tanto, una validación directa de la operación de los equipos de membrana asegurando la calidad objetivo. De hecho, la propia EMA invita a la adopción de estas técnicas y establece en el borrador del nuevo anexo 1 “Los

fabricantes deben considerar la adopción de sistemas adecuados de vigilancia rápida o automatizada para agilizar la detección de problemas de contaminación microbiológica y reducir el riesgo para el producto³.

No es el objetivo de este artículo tratar el diseño de estos sistemas, pero es oportuno dejar aquí constancia de que para una operación correcta de los equipos de membrana es imprescindible, aún más que en un equipo termal, un diseño y operación correctos. Por ponerlo en palabras de la EMA: la equivalencia en la calidad de WFI en equipos de membrana no significa simplemente el cumplimiento de las especificaciones compendiales, sino que también debe tener en cuenta la robustez del método de producción².

LA ESTERILIZACIÓN DE WFI POR TEMPERATURA

La destilación es el método utilizado históricamente para obtención de WFI. Este proceso se divide en dos fases,

primero calentaremos el agua hasta hacerla evaporar y luego la condensaremos. Ese condensado es WFI.

Al evaporarse el agua el calentamiento produce una pérdida de viabilidad en los microorganismos inicialmente presentes en el agua. De hecho, todas las formas de vida son sensibles a la temperatura y pueden inactivarse permanentemente si se exponen a una temperatura lo suficientemente alta. Sin embargo, otros factores como el pH, la composición química del medio y la forma de administrar el calor también pueden tener un impacto significativo en la tasa de inactivación. Por ejemplo, un calor húmedo, como el que tendremos en los equipos de WFI termal, es mucho más eficaz que el calor seco. Esto se debe a que al condensarse el vapor libera una cantidad muy significativa de energía debido al calor latente. Además, el coeficiente de transferencia de calor del vapor de condensación es uno de los más altos que se pueden alcanzar con una sustancia corriente. Esto maximiza las posibilidades de que el calor penetre y se libere en todas las partes del material sometido a esterilización.



De especialistas para especialistas

Proyectos de traducción multilingüe para la industria biotecnológica, biofarmacéutica y de productos sanitarios



Más de 25 años de experiencia

Confidencialidad, calidad y precisión



C/ Luis Mitjans 31, 4ºB
28007 Madrid
Tlf: 911734072
www.amr-traduccion.com
amrtradu@amr-traduccion.com

Dado que el agua sólo hierve a 100°C y que esta temperatura es demasiado baja para ser de alguna utilidad práctica para la esterilización (ya que daría lugar a tiempos de exposición inaceptablemente largos para ser eficaz), los procesos de esterilización por vapor se llevan a cabo en recipientes a presión. Al aplicar presión al vapor incrementamos la energía contenida en este y por ende la temperatura de este, eso lo hace por un lado más eficiente energéticamente y por otro, más letal.

Aquí es donde recuperamos el parámetro F_0 que nos servirá para comparar la letalidad del vapor a diferentes temperaturas. Tomaremos como base el valor de aplicación de vapor de 15 minutos a 121°C ($F_0 = 15$). Dicho valor se acepta como aquel que lograría niveles de esterilidad aceptables. Para alcanzar ese valor con vapor a 110°C serán necesarios unos 194 minutos y para conseguir el mismo valor paramétrico con vapor a 170°C necesitaremos unos 0,01 segundos. En general si deseamos asegurar un nivel elevado de esterilidad (D_{999999} o 6 logaritmos) tendremos que asegurar $F_0 = 15$.

DESTILADORES MULTIEFECTO Y TERMOCOMPRESORES

Existen dos tecnologías para generar WFI por destilación: los destiladores de efecto múltiple (MED) y la destilación por compresión de vapor o termocompresión. Aunque los principios generales de ambas tecnologías son similares existen algunas diferencias importantes entre ellas.

La tecnología de compresión de vapor (Fig. 4) se basa en la recuperación de calor y para ello utiliza el calor latente del vapor del agua. En el termocompresor

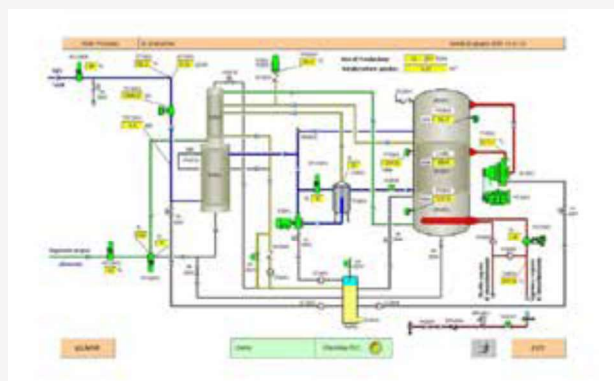


Figura 4.

el agua alimentación es vaporizada en una columna y luego sobrecalentada haciéndola pasar a través un compresor. Este proceso por un lado aprovecha al máximo la energía del vapor de agua sin requerir elevar la temperatura del vapor significativamente sobre la temperatura de vapor a presión a atmosférica y por otro el sobrecalentamiento por incremento de presión conseguido en el compresor es más eficiente al incrementar el calor latente del agua con un menor consumo energético que si sobrecalentamos el vapor directamente.

Por su lado, los destiladores de múltiple efecto (Fig 5) son equipos multicolumna que utilizan el vapor de planta (o la electricidad) para el calentamiento en la primera columna (o efecto) del proceso, evaporando el agua contenida en la columna. Este vapor es después condensado haciéndolo pasar por un intercambiador y el líquido obtenido es WFI. Este proceso es tremendamente ineficiente, de hecho, en un destilador con una sola columna serían necesarias grandes cantidades de vapor y agua de enfriamiento para conseguir WFI, por ello, estos equipos se diseñan con varias columnas y sistemas de intercambio (como precalentadores) para alcanzar eficiencias más razonables. Al disponer de varias columnas, y siempre que la presión del vapor de entrada sea lo suficientemente alta, podemos utilizar el calor latente de la primera columna para calentar la siguiente y así sucesivamente, hasta 8 columnas.

Por tanto, la tecnología de compresión de vapor suele destilar a temperaturas más bajas, unos 130°C, o por ponerlo en términos de $F_0=15$, unos 12 minutos, mientras que el proceso de los destiladores multiefecto utilizaremos la máxima presión de vapor disponible y toda el agua se verá sometida en la primera columna a la misma temperatura de evaporación de la segunda columna como mínimo. La temperatura en esa columna suele ser unos diez grados inferior a la de primera con



Por tratarse de un tema relevante e íntimamente conectado con este artículo, trataremos la eficiencia energética en sistemas WFI en una próxima entrega

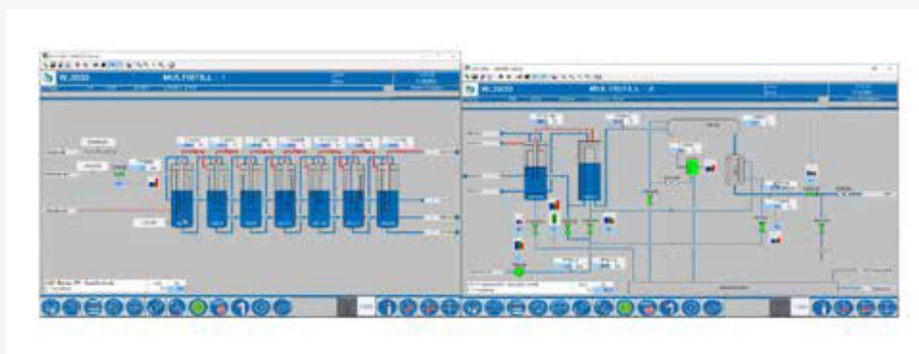


Figura 5.

lo que si alimentamos el destilador con vapor a 5 bares tendremos una temperatura aproximada de 135°C en la segunda columna y un $F_0=15$ de unos 30 segundos. Si aumentamos la presión de vapor a 8 bares los tiempos de $F_0=15$ estarán netamente por debajo de 1 segundo. Dependiendo del tamaño del equipo y las velocidades de circulación en general para conseguir $F_0=15$ serán necesarias temperaturas por encima de 150°C en la segunda columna.

En conclusión, si bien como ya hemos dicho al inicio, ambas tecnologías aseguran la obtención de WFI de acuerdo con los requisitos compendiales, si se desea asegurar un grado máximo de esterilidad los equipos MED alimentados a más de 7 bares son una buena alternativa.

ENDOTOXINAS

La presencia de endotoxinas en los productos inyectables puede dar lugar a respuestas pirogénicas que van desde la fiebre hasta un shock séptico irreversible y mortal. Aunque las endotoxinas pueden no ser un problema para todos los fabricantes de cultivos celulares, claramente lo son para algunos. También se ha demostrado que las endotoxinas afectan al crecimiento y la función de las células en muchos procesos de fermentación, además de ser una fuente de variabilidad significativa con lo que pueden tener efectos adversos en un proceso de fermentación⁵.

Las endotoxinas son fundamentalmente lipopolisacáridos (LPS) que se derivan de las membranas celulares de las bacterias gram negativas que las liberan continuamente en el medio, en pequeñas cantidades cuando están en crecimiento activo, y en grandes cantidades cuando mueren. La endotoxina tiene una pequeña parte lípida que ancla el LPS a la membrana bacteriana y es responsable de sus efectos patógenos.

Las endotoxinas son moléculas muy estables capaces de resistir temperaturas y valores de pH extremos por lo que no se inactivan eficazmente con los procedimientos habituales de esterilización por calor con tratamiento térmico a 121°C. El único proceso conocido para destruir eficientemente las endotoxinas implica la exposición de éstas a

una temperatura de 250°C durante más de 30 min o a F_0 's equivalentes⁶.

Las endotoxinas pueden variar significativamente el tamaño por lo que la unidad de medida que utilizamos de hecho mide la parte lípida que es la más pequeña y a su vez la que puede producir efectos pirogénicos. Dado que el tamaño de esa parte puede ser tan pequeña como 3 KD será necesario disponer de un método que asegure su eliminación.

La principal fuente de endotoxinas es el agua de calidad farmacéutica debido a la posibilidad de que haya bacterias Gram negativas. El límite compendial de endotoxinas para WFI de 0,25 EU/ml se obtendría a partir de la desnaturalización de 10^4 bacterias/ml, por tanto, la mejor manera de evitar las endotoxinas es evitar las bacterias en el agua y rechazar o retener las que puedan permanecer en ella.

En equipos termales eso está relacionado con el diseño de las columnas, aquí solo diremos que la clave está en una buena separación y en evitar las gotas que pueden contener endotoxinas y que podrían ser arrastradas por el vapor ●

Referencias

1. Referencia: EMA; Guideline on the sterilisation of the medicinal product active substance, excipient and primary container).
2. Referencia: Press Release; European Pharmacopoeia Commission adopts revised monograph on Water for Injections allowing production by non-distillation technologies)
3. Referencia: GMP Annex 1 V12 2020 Draft_annex1ps_sterile_medicinal_products_en
4. D. Pistolesi, V. Mascherpa F_0 A technical note. 1988 R&D Fedegari
5. Case Gould, M.J. Endotoxin in Vertebrate Cell Culture: Its Measurement and Significance. In Uses and Standardization of Vertebrate Cell Lines, (Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD, 1984).
6. Ryan, J. 2004. Endotoxins and cell culture. Corning Life Sci. Tech. Bull. 2004:1-8.